

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 335 198 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
13.08.2003 Patentblatt 2003/33

(51) Int Cl.7: **G01N 15/10**, **G01N 33/487**,
B03C 5/00

(21) Anmeldenummer: **02002437.8**

(22) Anmeldetag: **01.02.2002**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

• **Wüthrich, Martin**
2000 Neuchâtel (CH)
• **Renaud, Philippe**
1028 Préverenges (CH)

(71) Anmelder: **Leister Process Technologies**
6060 Sarnen (CH)

(74) Vertreter: **Klocke, Peter, Dipl.-Ing.**
ABACUS Patentanwälte
Klocke Späth Barth
European Patent and Trademark Attorneys
Kappelstrasse 8
72160 Horb (DE)

(72) Erfinder:
• **Gawad, Shady**
1110 Morges (CH)

(54) **Mikrofluidisches Bauelement und Verfahren für die Sortierung von Partikeln in einem Fluid**

(57) Mikrotechnologisch hergestelltes Bauelement als Durchflusszytometer. Das Bauelement beinhaltet einen Vorbereitungsbereich zur gezielten Beeinflussung und Vereinzelung der Partikel vorzugsweise mittels Dielektrophorese, einen Messkanalbereich zur Charakterisierung der Partikel und einen Sortierbereich zum Sortieren der in dem Messkanalbereich identifizierten Partikel mittels Dielektrophorese. Die Sortierung beinhaltet

Schaltelemente, die eine aktive Führung der Partikel in zwei oder mehrere Unterkanäle entsprechend den Kriterien, die in dem Messkanalbereich gefasst wurden, erlauben. Mittels eines derartigen ausgestalteten Bauelements zum Einsatz eines Durchflusszytometers kann eine schnelle und präzise Sortierung von Partikel, insbesondere biologischen Zellen in einer Suspension realisiert werden.

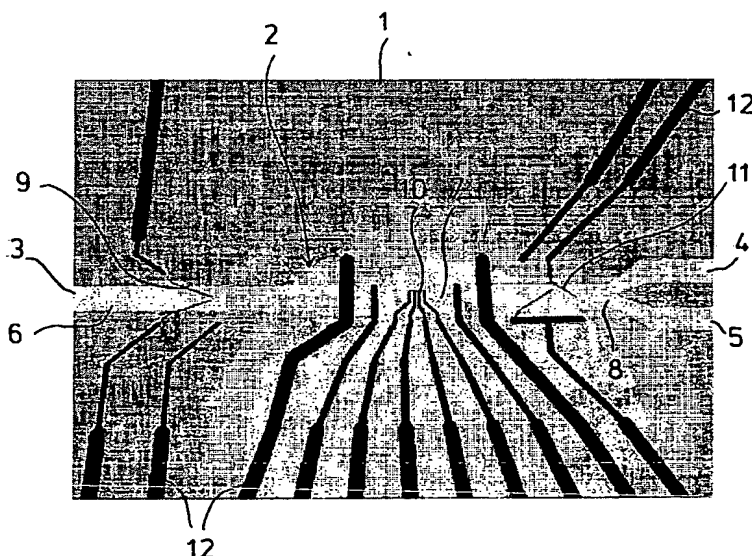


Fig.1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein mikrofluidisches Bauelement aus einem Substrat mit einem Kanal zum Durchführen individueller Partikel zum Sortieren von Partikel in einem Fluidstrom, insbesondere Flüssigkeitsstrom sowie ein Verfahren zum Sortieren von Partikeln.

[0002] Die Manipulierung suspendierter Teilchen ist allgemein bekannt und wird beispielsweise von G. Fuhr et al in "Naturwissenschaften" Band 81, 1994, Seite 528 ff, beschrieben. Bei den suspendierten Teilchen kann es sich dabei um beliebige Partikel oder auch biologische Zellen handeln. Im Nachfolgenden wird daher allgemein nur von Partikel gesprochen. Die Mikrosysteme bilden insbesondere Kanalstrukturen, die von einer Suspensionsflüssigkeit mit den zu manipulierenden Partikeln beströmt werden. In den Kanalstrukturen sind auf den Kanalwänden Mikroelektroden angebracht, die mit hochfrequenten elektrischen Feldern beaufschlagt werden. Unter der Wirkung der hochfrequenten elektrischen Felder zwischen zwei Elektroden werden in den suspendierten Partikeln auf der Basis negativer oder positiver Dielektrophorese Polarisationskräfte erzeugt, die eine Abstoßung oder Anziehung von den Elektroden und in Zusammenarbeit mit Strömungskräften in der Suspensionsflüssigkeit eine Manipulierung der Teilchen im Kanal erlauben. Derartige Elektroden sind beispielsweise in der WO 00 00 293 beschrieben.

[0003] In S. Gawad et al, "1st Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology October 12-14, 2000, Lyon, FRANCE" Seiten 1 bis 5 sowie aus S. Gawad et al "Lab on a Chip", 2001, 1, Seite 76 bis 82 ist bekannt, Zellen in einem Mikrokanal mittels der Impedanzspektroskopie zu analysieren. Hierbei werden in dem Kanal eingebettete Elektroden verwendet, so dass mindestens zwei Feldbereiche entstehen, in denen eine Impedanzmessung durchgeführt wird. Die Auswertung erfolgt dann durch eine Differenzmessung, beispielsweise mittels einer Messbrücke. Hinsichtlich weiterer Details wird auf diese Veröffentlichungen sowie die darin angegebenen Erläuterungen zu dem Messprinzip sowie zum Stand der Technik verwiesen.

[0004] Die Ergebnisse einer derartigen Analyse können dann verwendet werden, um im Anschluss daran eine Zellsortierung durchzuführen. Hier ist es ebenfalls bekannt, eine auf Dielektrophorese basierende Zellsortierung durchzuführen. So ist beispielsweise aus der US 4 326 934 bekannt, mittels Dielektrophorese Schwefel aus Öl zu extrahieren.

[0005] Aus der US 5 489 506 ist ein Verfahren und eine Vorrichtung zum kontinuierlichen Aussortieren lebender Zellen aus einer Mischung bekannt, bei der die an einer oder mehreren Elektroden vorbeikommenden Zellen entsprechend ihrer Größe, physikalischer Konstruktion, chemischen Zusammensetzung und elektronischen Eigenschaften aussortiert werden, wobei die

Elektroden an Radiofrequenzgeneratoren angeschlossen sind.

[0006] Bei den vorstehend beschriebenen Verfahren werden die unterschiedlichen elektrophoretischen Eigenschaften der Partikel genutzt, um diese aus dem Fluidstrom auszuleiten. Es handelt sich hierbei um eine passive Sortierung, da eine gezielte Entscheidung, ob der Partikel ausgeleitet werden soll oder nicht, nicht getroffen werden kann.

[0007] Die bisher bekannten Einrichtungen zur Charakterisierung von Partikeln, insbesondere biologischen Zellen, Sortierung und Zählung (Zytometer) zeichnen sich durch sehr aufwendige Einrichtungen aus, die in der Regel aus einer optischen Analyseeinrichtung basierend auf FACS (Fluorescence-activated cell sorting) oder aus einer Kombination von optischen und elektrischen Messeinrichtungen bestehen. Eine rein elektrische Erkennung und Sortierung wird nicht durchgeführt. Daher ist bei diesen Einrichtungen eine zusätzliche Präparation der Partikel für die optische Analyse erforderlich. Dies macht die Analyse mittels derartiger Einrichtungen aufwendig und zeitintensiv.

[0008] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein elektrisches Durchflusszytometer vorzuschlagen, das auf einem Substrat in Mikro- bzw. Nanotechnologie die Identifizierung sowie Zählung und Sortierung möglichst schnell und genau ermöglicht.

[0009] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein mikrofluidisches Bauelement aus einem Substrat gemäß Anspruch 1 sowie einem Verfahren gemäß Anspruch 16 gelöst. Weiterer vorteilhafter Ausgestaltungen sind den Unteransprüchen zu entnehmen.

[0010] Die Grundidee der Erfindung besteht darin, auf einem Trägermaterial im nachfolgenden Substrat genannt, in mindestens einem länglichen Kanal, durch die die individuellen Partikel in einem Fluid hindurchgeführt werden, diese zuerst in einem ersten Bereich in dem Fluidstrom für die nachfolgende Messung in einem zweiten Messkanalbereich vorzubereiten und anschließend nach dem Verlassen des Messkanalbereichs aufgrund der erfassten Eigenschaften der Partikel diese in einem dritten Bereich, dem Sortierbereich, zu trennen. Dabei kann die Trennung selbstverständlich in mehr als nur zwei verschiedene Arten vorgenommen werden. Demzufolge umfasst der Kanal einen Vorbereitungs- bereich mit ersten Elektrodeneinrichtungen zur gezielten Beeinflussung und Vereinzelung der Partikel, vorzugsweise mittels Dielektrophorese. Daran schließt sich der Messkanalbereich mit zweiten Elektrodeneinrichtungen zur Charakterisierung der Partikel an. Dann folgt der Sortierbereich mit dritten Elektrodeneinrichtungen zum Sortieren der in dem Messkanalbereich identifizierten Partikel mittels Dielektrophorese. Auf dem Substrat befinden sich selbstverständlich außerdem Leiterbahnen, die elektrisch mit den jeweiligen Elektroden verbunden sind, um Signale zu den Elektroden bzw. von den Elektroden weg zu übertragen. Hierzu ist das Bauelement an entsprechenden Mess- und Steuereinrichtungen an-

zuschließen, die nicht Gegenstand der Erfindung sind.

[0011] Die Querschnitte der einzelnen Bereiche variieren dabei in der Art, dass der Querschnitt des Kanals (Messkanal) in dem Messkanalbereich wesentlich geringer ist als der Querschnitt im Vorbereitungs- und im Sortierbereich.

[0012] Die im Zusammenhang mit Dielektrophorese verwendeten Elektrodenanordnungen bestehen immer aus einem Paar gleicher Elektroden, die in der Regel am Rand seitlich oder oben und unten an den Kanalwänden angebracht sind, so dass sich in den übereinstimmenden Bereichen zwischen den einzelnen Elektroden ein elektrisches Feld aufbauen kann, das die Partikel zu den gewünschten Bewegungen veranlasst. Im Nachfolgenden werden daher die Begriffe Elektroden oder Elektrodenpaar als Synonyme verwendet.

[0013] Damit überhaupt eine Charakterisierung und anschließende Sortierung möglich ist, ist es erforderlich, in dem Vorbereitungsbereich die Partikel, die möglicherweise in Haufen (Cluster) zusammenhängen zu Vereinzeln und anschließend kontrolliert dem Messkanalbereich zuzuführen. Dies geschieht vorzugsweise mittels entsprechenden Elektrodenanordnungen, so dass die Partikel mittels Dielektrophorese und der dadurch auf die Partikel einwirkenden Kräfte vereinzelt und in die entsprechende Partikelbahn gebracht werden.

[0014] Gemäß einer bevorzugten Ausbildung weisen die Elektrodenanordnungen zum Vereinzeln der Partikel Elektrodenanordnungen auf, die schräg zur Strömungsrichtung angeordnete erste Elektroden mit einer im wesentlichen trichterähnlichen Anordnung enthalten, und in Strömungsrichtung daran anschließende beabstandete parallele zweite Elektroden in einer ebenfalls trichterförmigen Anordnung mit einer Durchtrittsöffnung enthalten. Dabei werden die daran anschließenden parallelen zweiten Elektroden andauernd auf Potenzial gehalten, so dass ankommende Partikel aufgehalten und nur dann durch die Durchtrittsöffnung gelangen können, wenn sie einzeln hindurchtreten. Größere Cluster können nicht hindurch. Durch die Ausgestaltung stellt die Durchtrittsöffnung einen schmalen Schlitz in dem Kanal dar. Zur Trennung der vor der Durchtrittsöffnung befindlichen Cluster werden die ersten Elektroden gepulst, so dass aufgrund der dadurch auftretenden Kräfte die einzelnen Partikel versuchen, zu entweichen und sich dabei von den anderen Partikel lösen. Der Abstand zwischen den Elektroden beträgt vorzugsweise das zwei- bis vierfache des Partikeldurchmessers.

[0015] Im Anschluss daran findet eine Ausrichtung der Partikel in dem Fluidstrom statt, so dass die Partikel sich auf eine definierten Partikelbahn bewegen. Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführung schließt sich an die erste Elektrodenanordnung zum Vereinzeln direkt eine zweite Elektrodenanordnung zum Ausrichten der Partikel auf eine definierte Partikelbahn. Vorzugsweise wird die Elektrodenanordnung zum Vereinzeln gleich mit der Elektrodenanordnung zum Ausrichten kombi-

niert, in dem die vorstehend erwähnten zweiten parallele Elektroden mit der Durchtrittsöffnung verlängerte parallele Elektrodenarme im Abstand der Breite Durchtrittsöffnung (Spalt) aufweisen. Diese Elektrodenanordnung umfasst somit zwei im Abstand der Spaltbreite angeordnete obere Elektrodenarme und zwei zugehörige untere Elektrodenarme, wobei die jeweils die an einer zugeordneten oberen und unteren Elektroden ein Feld aufbauen. Durch die Anordnung von vier Elektrodenarme werden die Partikel versuchen, den Gleichgewichtszustand genau in der Mitte zu finden. Hierzu ist erforderlich, dass die Länge der Elektrodenarmen in Bezug auf die Durchflussgeschwindigkeit der Lösung ausreichend lang sind, damit der Gleichgewichtszustand erreicht werden kann. Die Breite der Durchtrittsöffnung bzw. der Abstand der Elektrodenarme ist geringfügig größer als die Partikel.

[0016] Diese derart vorbereiteten Partikel gelangen nun in den Messkanalbereich, der vorzugsweise einen Querschnitt aufweist, der nur geringfügig größer ist als die durchströmenden Partikel. Seine typische Kanalgröße kann 5 bis 10 µm betragen. Der Durchgang eines Partikels, insbesondere beispielsweise einer einzelnen Zelle, wird erfasst und identifiziert durch die Veränderung der elektrischen Impedanz, die, im Falle einer Zelle, zu den Eigenschaften der Zellgröße, Zellmembran und des Cytoplasmas in Bezug steht. Hinsichtlich der Messungen und der Anordnungen der Elektroden wird auf die vorstehend erwähnten Artikel von Gawad al. verwiesen.

[0017] Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird ein breiterer Messkanal verwendet, was den Vorteil hat, dass die Gefahr einer Verstopfung reduziert wird. In diesem breiteren Messkanal werden die einzelnen Partikel mittels Dielektrophorese auf eine bestimmte Bahn auf einer Seite des Kanals gelenkt und durchtreten dann das Messfeld zwischen zwei Elektroden, wobei das Referenzfeld in dem Bereich angeordnet ist, in dem keine Partikel sich bewegen.

[0018] Die Abmessungen des Kanals liegen in der Größenordnung der zu messenden typischen Partikelgröße oder eine Größenordnung darüber. Die Elektroden können auf verschiedene Arten an den Wänden angeordnet werden, um wenigstens zwei Detektionsbereiche in dem gleichen Kanal vorzusehen. Die Elektroden können nacheinander an einer Seite des Kanals, den Kanal umkreisend, nur oben, oder oben und unten bzw. seitlich angeordnet sein. Wenn die Elektroden nacheinander nur an einer Seite des Kanals angeordnet sind, erfolgt eine starke Beeinflussung der Partikelposition während der Messung. Sofern die Position der Partikel genau bestimmt werden soll, ist es zweckmäßiger, die Messung durch eine Differenzmessung zwischen einem versetzten oberen und unteren Elektrodenpaar vorzunehmen. Das bewirkt, dass je nach vertikaler Ausrichtung des Partikels die oberen oder unteren Elektroden mehr oder weniger beeinflusst werden. Entsprechend kann dies an den seitlichen Wänden erfolgen.

[0019] Nachdem die einzelnen Partikel den Messkanalbereich durchlaufen haben, gelangen sie in den Sortierelektrodenbereich mit einem größeren Querschnitt. Damit eine ordnungsgemäße Sortierung möglich ist, befindet sich gemäß einer bevorzugten Ausführungsform vor der Sortierelektrodenanordnung eine Elektrodenanordnung zum Ausrichten der Partikel, um diese auf eine möglichst schmale Bahn im Fluidstrom zu leiten. Dies ermöglicht die exakte Aussortierung mit hoher Geschwindigkeit, da die entsprechende Elektroden eine geringe Elektrodenlänge aufweisen können und damit der Weg der aussortierten, aus der Partikelbahn ausgeleiteten Partikel entlang der Elektroden kurz ist und daher relativ schnell im Anschluss daran eine neue Auswahl getroffen werden kann.

[0020] Gemäß einer besonders bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung weisen die Elektrodenanordnungen in dem Sortierbereich eine erste Sortierelektrodenanordnung und wenigstens eine zweite Sortierelektrodenanordnung auf, wobei die erste Sortierelektrodenanordnung in der Bahn der Partikel und die zweite Sortierelektrodenanordnung seitlich der Bahnen der Partikel angeordnet ist, um von der ersten Sortierelektrodenanordnung aussortierte Partikel gezielt weiterzuleiten. Vorzugsweise weist die zweite Sortierelektrodenanordnung einen Ausgang zum Passieren des Partikels auf, so dass die aussortierten Partikel sich auf einer zweiten Bahn, im wesentlichen parallel zu der ersten Partikelbahn bewegen. Im Anschluss daran, ist eine Gabelung in dem Kanal angeordnet, die den Fluidstrom entsprechend den Partikelbahnen teilt. Damit weist das Substrat einen Eingang und wenigstens zwei Ausgänge auf. Die Ausgänge können dann entsprechenden Aufnahmebehälter oder dgl. zugeführt werden.

[0021] Damit auch eine Observation und Detektion mittels optischen Verfahren möglich ist, ist es zweckmäßig, das Substrat transparent auszubilden.

[0022] Das Substrat gemäß der Erfindung erlaubt somit auf kleinstem Raum die Bestimmung von einzelnen Partikeln einer Vielzahl von durchlaufenden Partikeln in der Größenordnung von 100 oder mehr Partikeln pro Sekunde. Die Erfindung ermöglicht die Positionierung der Partikel, die Messung der Impedanz, die Geschwindigkeit oder die Position der strömenden Partikel in dem Messkanal und eine Durchfluss-Schaltanordnung in dem Sortierbereich, die es erlaubt, die Partikel in zwei oder mehrere Unterkanäle gemäß den zuvor bestimmten Kriterien in dem Messbereich zu leiten. Ein derartiges mikrotechnologisches hergestelltes Bauelement kann benutzt werden, um Zellen zu zählen, zu unterscheiden und entsprechend ihres Typus, ihrer Größe, ihrer Zellmembraneigenschaften, der Anwesenheit und/oder der Aktivität von spezifischen Membranrezeptoren zu sortieren. Im Rahmen der Sortierung ist somit auch das Identifizieren und Zählen von Partikeln möglich.

[0023] Gemäß dem Verfahren zum Sortieren von Partikeln in einem Fluidstrom durch ein mikrofluidisches Bauelement werden folgende Schritte durchgeführt:

A Vereinzelung der Partikel mittels Dielektrophorese und anschließender Positionierung der Partikel in der räumlichen Mitte des Fluidstromes,

B Charakterisieren der vereinzelt Partikel in einem engen Fluidstrom in einem Messkanalbereich durch Impedanzmessung,

C Sortieren der in dem Messkanalbereich erfassten Partikel aufgrund der in B ermittelten Kenngrößen mittels Dielektrophorese durch aktives Aussortieren von Partikeln aus der Partikelbahn und gezieltes Weiterleiten der aussortierten Partikel in einer zweiten Partikelbahn, die im wesentlichen parallel zu der ersten Partikelbahn verläuft,

D Trennen des Fluidstromes entsprechend den Partikelbahnen und

E gegebenenfalls Wiederholen der Schritte C. und D.

[0024] Sofern eine weitere Unterteilung und Sortierung erfolgen soll, werden die Schritte C und D entsprechend oft wiederholt.

[0025] Zur Erzeugung der elektrischen Felder werden vorzugsweise eine oder verschiedene Spannungen mit einer Frequenz von 1 kHz bis 200 MHz, zweckmäßigerweise mit Spitze-zu-Spitze-Spannungen von maximal 2 V verwendet.

[0026] Vorteilhafterweise werden vor dem Sortieren die Geschwindigkeit der Partikel optisch oder elektrisch gemessen.

[0027] Grundsätzlich ist es möglich, das Verfahren mittels auf dem Bauelement angeordneten und integrierten oder auch mit externen Einrichtungen zur Feldderzeugung zu durchzuführen.

[0028] Zur weiteren Verdeutlichung der Erfindung wird nachfolgend diese in Verbindung mit den begleitenden Zeichnungen anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Es stellen dar:

Figur 1 die Draufsicht auf ein Bauelement mit einer schematischen Andeutung eines Kanals mit den einzelnen Bereichen;

Figur 2 verschiedene Ausführungsformen und Ansichten für Anordnungen zur Vereinzelung von Partikeln mit der Draufsicht auf eine erste Anordnung (Figur 2a), der entsprechenden Schnittdarstellung in der Mitte des Kanals (Figur 2b), und die Draufsicht auf eine andere Elektrodenanordnung zur Vereinzelung (Figur 2c);

Figur 3 die Elektrodenanordnung zum Positionieren der Partikel in dem Fluidstrom in der Draufsicht (Figur 3a) und der seitlichen Schnittdarstellung (Figur 3b);

Figur 4 die Kombination einer Elektrodenanordnung gemäß den Figuren 2a und 3a in der Draufsicht;

Figur 5 zwei verschiedene Elektrodenanordnungen für den Messkanalbereich einmal mit engem

Messkanal (Figur 5a) und breiterem Kanal (Figur 5b);
 Figur 6 verschiedene Elektrodenanordnungen für die Ausrichtung und Sortierung in dem Sortierbereich mit einer ersten geometrischen Anordnung (Figur 6a), einer zweiten anderen geometrischen Anordnung (Figur 6b), eine dritten geometrischen Anordnung nur der Elektroden zum Ableiten der aussortierten Partikel (Figur 6c) und die Anordnung gemäß Figur 6a in vergrößerter Darstellung mit der Bahn der Partikel (Figur 6d).

[0029] Aus der schematischen Ansicht in Figur 1 ist in der Draufsicht ein mikrofluidisches Bauelement 1 dargestellt, das einen länglichen Kanal 2 zeigt, der auf der linken Seite einer Einlassöffnung 3 und auf der rechten Seite zwei Auslassöffnungen 4 und 5 aufweist. Selbstverständlich kann ein entsprechendes Bauelement 1, sofern erforderlich, auch mehrere Auslassöffnungen oder auch Einlassöffnungen aufweisen. Die Einlassöffnungen können an entsprechend geeignete Einrichtungen zum Zuführen eines Fluids das flüssig oder eventuell auch gasförmig sein kann, angeschlossen werden. Entsprechend sind auch die Auslassöffnungen 4 und 5 an entsprechende Einrichtungen zur Aufnahme der aussortierten Partikel angeschlossen. Im nachfolgenden wird im Zusammenhang mit den Ausführungsbeispielen von einer Flüssigkeit ausgegangen, die verschiedenartige Partikel, beispielsweise biologische Zellen, transportiert.

[0030] Der Kanal 2 unterteilt sich in einen Vorbereitungsbereich 6, einen Messkanalbereich 7 und einen Sortierbereich 8. Die Querschnitte der einzelnen Bereiche sind unterschiedlich, wobei insbesondere der Messkanalbereich 7 wesentlich schmaler ist als die beiden anderen Bereiche 6, 8. In den einzelnen Bereichen 6 bis 8 befinden sich schematisch angedeutete Elektrodenanordnungen 9 bis 11, die über zugeordnete Leiterbahnen 12 an eine externe und nicht dargestellte Steuer- und Messeinrichtung anschließbar sind. Die einzelnen Bereichen mit ihren Elektrodenanordnungen sind im Nachfolgenden in Verbindung mit den Figuren weiter erläutert.

[0031] Die Herstellung eines derartigen Bauelements kann beispielsweise in der Art erfolgen, dass auf einem Glassubstrat zuerst ein Lift-off-Resist zur Festlegung der Positionen der Elektroden photolithographisch aufgebracht wird. Nach dem Aufbringen einer Haftschrift, beispielsweise Titan, wird anschließend ein Edelmetall, beispielsweise Platin als Elektrodenmaterial sowie ein Leitermaterial, beispielsweise Kupfer für einen Anschluss der Elektroden niedergeschlagen. Nach dem Entfernen des Lift-off-Resists wird photolithographisch Polyimid als Kanalwände aufgebracht. Anschließend wird das Substrat mit einem deckungsgleichen zweiten Substrat zu einer Sandwich-Struktur mit eingeschlossenen Kanälen und Elektroden zusammengefügt. Die Dicke

der Platinschicht kann dabei ungefähr 200 nm und die Dicke der Titanschicht ungefähr 50 nm betragen. Die Polyimidschicht beträgt 1 bis 20 µm.

[0032] Es ist auch möglich, als Substratmaterial ein anderes Material, beispielsweise Kunststoff zu verwenden, und Replikationsverfahren einzusetzen.

[0033] Figur 2 zeigt verschiedene Arten der Vereinzelung von Partikeln. In der Figur 2a ist die Draufsicht auf eine Elektrodenanordnung mit einer ersten Vereinzelungselektrode 13 und zweiten Vereinzelungselektroden 14' und 14'' dargestellt. Beide Vereinzelungselektroden sind schräg zu den Wänden 15, 16 angeordnet und weisen dadurch eine trichterähnliche Form auf, die bewirkt, dass die in diesem Kanalbereich bewegenden Partikel 17 bzw. Partikel Cluster 18 auf Grund der Feldkräfte bewegt werden.

[0034] In den Draufsichten der nachfolgenden Figuren sind in der Regel nur die oberen Elektroden gezeigt. Wie vorstehend erwähnt, ist es für Beeinflussung der Partikel aufgrund von Dielektrophorese selbstverständlich, dass auch eine entsprechende untere Elektrode vorhanden ist, die mit der oberen Elektrode zusammenwirkt und damit das entsprechende elektrische Feld aufbaut, das die Beeinflussung der Partikel bewirkt.

[0035] Die Vereinzelungselektrode 13 kann selbstverständlich auch mit spitz zulaufenden schrägen Elektrodenteilen ausgebildet sein. Die Elektroden 14', 14'' sind im wesentlichen parallel zu der ersten Vereinzelungselektrode 13 schräg zu den Wänden 15, 16 angeordnet. Im Unterschied zu der Vereinzelungselektrode 13 berühren sie sich am Ende nicht, sondern lassen eine Öffnung 19 für den Durchtritt der Partikel 17. Die Öffnung 19 entspricht dem durchschnittlichen Partikeldurchmesser oder ist geringfügig größer. Die Vereinzelungselektroden 14' und 14'' sind permanent angeschaltet und stellen damit eine Barriere dar, die die Partikelcluster 18 aufhält. Die Elektrode 13 wird gepulst und bricht damit die Cluster auf. Dies ist beispielhaft in der Seitendarstellung gemäß Figur 2b gezeigt. Sobald die Partikel 17 aus dem Partikelcluster 18 gelöst sind, können sie durch die Öffnung 19 hindurch.

[0036] Figur 2c zeigt eine andere Variante mit einer anderen Ausgestaltung mit mehreren nebeneinander angeordneten Vereinzelungselektroden 13 bzw. 14. Der Abstand zwischen den Vereinzelungselektroden 13 und den Vereinzelungselektroden 14 ist bei allen Ausführungsformen so gewählt, dass er größer ist als der Partikeldurchmesser, jedoch kleiner als die zu erwartende Partikelclustergröße.

[0037] Für die anschließende Ausrichtung der Partikel 17 in einer Bahn an einer gewünschten Position in dem Kanal 2 kann eine Elektrodenanordnung gemäß der Figur 3a verwendet werden. Diese zeigt die Draufsicht auf trichterförmige Positionierelektroden 20 und 21 mit jeweils einem schräg zur Wand 15 bzw. 16 verlaufenden Elektrodenarm 22 und parallelen Elektrodenarmen 23. Alle diese Elektroden sind eingeschaltet, wobei die Positionierelektrodenarme 22 bewirken, dass sich

in dem Kanal bewegende Partikel 17 seitlich zur Mitte hin bewegen. Die Positionierelektrodenarme 23 bewirken die vertikale Positionierung der Partikel wie es in der Figur 3b gezeigt ist. Wichtig ist dabei, dass die Länge der parallelen Positionierelektrodenarme 23, denen, wie vorstehend erwähnt, entsprechende Elektroden auf der Unterseite des Kanals gegenüberstehen, lang genug sind, um den auf die Partikel einwirkende vertikalen Kräften zu erlauben, einen Gleichgewichtszustand zu finden, so dass die Höhe der Ausgangsbahn der Partikel 17 konstant und in diesem Fall in dem Kanal zentriert ist. Durch die unteren Elektroden geben sich insgesamt vier Elektroden und da die Kraft auf die Partikel 17 höher ist, wenn sie sich in den Elektroden nähern, tendieren sie dazu, bei einem symmetrischen Elektrodendesign sich im Zentrum zu zentrieren. Der Abstand der Elektroden sollte daher auch so gewählt sein, dass die Partikel durch beide elektrische Felder (Feld der Elektrodenarme 22 und Feld der Elektrodenarme 23) beeinflusst wird. Der Abstand zwischen den Positionierelektrodenarmen 22 und 23 ist nur geringfügig größer als der Partikeldurchmesser.

[0038] Figur 4 zeigt eine Elektrodenanordnung aus der Kombination der Elektroden gemäß Figur 3a und Figur 2a, wobei die gepulste Vereinzelungselektrode 13 in diesem Ausführungsbeispiel spitz zulaufend ausgestaltet ist. Der Abstand der schräg verlaufenden Elektrodenteile beträgt das 2 bis 4fache des Partikeldurchmessers.

[0039] Figur 5 zeigt ein Ausführungsbeispiel für den Kanal 2 im Messkanalbereich 7 mit einer entsprechenden Elektrodenanordnung 10. Die Elektrodenanordnung 10 umfasst in diesem Ausführungsbeispiel in bekannter Art und Weise zwei voneinander beabstandete Elektrodenpaare 24 und 25, die dazu dienen, zwischen ihnen ein elektrisches Feld aufzubauen. Die Flüssigkeit und die Partikel fließen durch den Kanal 2 des Messkanalbereichs 7. Für die meisten Fälle enthält eine Flüssigkeit einen Elektrolyt der eine von den Partikeln verschiedene Impedanz aufweist. Die Elektrodenpaare 24 und 25 sind an ein nicht dargestelltes elektrisches System angeschlossen, das die Spannung über die einzelnen Elektroden sowie den Strom durch die Bereiche misst, die durch die Messelektrodenpaare 24 und 25 gebildet werden. Jedes Mal, wenn ein Partikel den Bereich des ersten Messelektrodenpaares 24 passiert, ändern sich die vorstehend erwähnten elektrischen Parameter. Der Bereich des Messelektrodenpaares 25 bleibt unverändert und dient als Referenz. Entsprechend verhält es sich umgekehrt, wenn ein Partikel 17 das zweite Messelektrodenpaar 25 passiert.

[0040] Die Veränderung der elektrischen Parameter wird gleichzeitig gemessen bei mehreren Wechselstromfrequenzen, was eine bessere Differenzbildung und genauere Bestimmungen der Parameter ermöglicht. Die gemessenen Parameter werden von einer nicht dargestellten Steuer- bzw. Messeinrichtung dazu benutzt, um die nachfolgende Sortierung durchzuführen.

ren.

[0041] Figur 5b zeigt eine andere Ausgestaltung mit einem breiteren Kanal 2 in dem Messkanalbereich 7, wobei ein Ablenkelektrodenpaar 26 die ankommenden Partikel 17 auf eine bestimmte Partikelbahn lenkt, die durch das Messelektrodenpaar 24 hindurch führt. Das Messelektrodenpaar 25 ist in dem Bereich des Kanals angeordnet, in dem sich keine Partikel 17 befinden. Damit dient das Messelektrodenpaar 25 immer als Referenz. Diese Ausgestaltung hat den Vorteil, dass durch den größeren Kanalbreite die Gefahr der Verstopfung reduziert ist. Die Messung kann trotzdem durch entsprechend kleine Ausgestaltungen der Elektroden wie in Figur 5a trotz vergrößerter Kanalbreite erfolgen. Die elektrischen Felder werden damit in Relation zu den Partikelgrößen konzentriert, d.h. der Einfluss eines großen Partikels auf das Feld ist größer als der Einfluss eines kleineren Partikels. Die Messungen werden daher genauer, wenn der Partikel eine möglichst große Fläche des Feldes überdeckt. Die zugehörige Messelektronik ist hier nicht dargestellt und auch nicht weiter erläutert (vergleiche hierzu vorstehend erwähnte Artikel von S. Gawad).

[0042] Figur 6 zeigt verschiedene Elektrodenanordnungen 11 in dem Sortierbereich 8. Diese Elektrodenanordnung erlaubt ein schnelles Sortieren der Partikel. Figur 6a zeigt zwei Ausrichtelektroden 27, 28, die die von dem Messkanal kommenden Partikel 17 in dem Ausführungsbeispiel in einem Bereich in der Nähe der einen Wand 15 des Kanals 2 bringt. Beide Ausrichtelektroden 27, 28 sind angeschaltet. Die Elektrode 29 ist die eigentliche Sortierelektrode, die, je nachdem, ob ein Partikel 17 auf der durch die Ausrichtelektroden 27 und 28 vorgegebenen Bahn bleiben soll, ausgeschaltet oder aber, wenn der Partikel 17 abgelenkt werden soll, eingeschaltet wird. Die Ableitelektrode 30 führt den abgelenkten Partikel weg und erlaubt aufgrund einer Öffnung 31 den Austritt des Partikels, so dass durch die nachfolgende Gabelung 32 eine Trennung der Partikel 17 in Richtung der beiden Auslassöffnungen 4 und 5 gemäß Figur 1 möglich ist. Die Figur 6b zeigt eine andere alternative Anordnung der Ausrichtelektroden 27 und 28, wobei die Elektrode 27 kürzer als die nachfolgenden Sortierelektrode 29 ausgebildet ist und der Wegführung der Partikel 17 von der Wand 15 dient. Die Ableitelektrode 30 zeigt hier beispielhaft eine andere geometrische Anordnung, ohne das Ausgangsergebnis zu beeinflussen. In den Figuren 6a und 6b sind bei der Ableitelektrode beide, das heißt die obere als auch die untere Elektrode parallel dargestellt, um zu verdeutlichen, dass nur in dem Bereich, in dem die untere und die obere Ableitelektrode als parallel dargestellt sind, die gewünschte Führung eines Partikels 17 erfolgt. In dem übrigen Bereich entsteht die Öffnung 31 für den Durchtritt.

[0043] Figur 6c zeigt eine weitere mögliche Ausgestaltung des Ableitelektrodenpaares 30.

[0044] Anhand der Figur 6d wird der Sortiervorgang näher erläutert. Er zeigt zwei mögliche Bahnen für die

Partikel 17. In bereits erwähnt, sind die Ausrichtelektroden 27, 28 und die Ableitelektroden 30 immer eingeschaltet. Das Sortierelektrodenpaar 29 wird dann aktiviert, wenn ein Partikel aussortiert werden soll. Dies bewirkt, dass der Partikel aus der an sich vorgesehenen Partikelbahn 33 abgelenkt und durch den Fluidstrom entlang der Partikelbahn 34 bewegt wird. Die Ableitelektroden 30 überlappen nicht auf der gesamten Strecke, so dass sie dadurch eine Öffnung 31 für die Partikel bilden, die dann auf eine im wesentlichen parallelen Bahn zu der Partikelbahn 33 sich weiter bewegen können. Um eine schnelle Aussortierung zu erreichen, ist es wichtig, dass die Länge der Sortierelektrode 29 möglichst gering ist, jedoch lang genug, dass im eingeschalteten Zustand der Partikel 17 seinen Weg zur Elektrode 30 fortsetzt und möglichst bald eine Ausschaltung des Sortierelektrodenpaares 29 für den nächsten Partikel erfolgen kann. Die Ableitelektrode 30 ist so angeordnet, dass Partikel, die nicht durch die Sortierelektrode 29 aussortiert werden, ihren Weg fortsetzen können, ohne zu stark durch die Ableitelektrode 30 beeinflusst zu werden.

[0045] Für die mittels Dielektrophorese gesteuerten Vorgänge werden Spannungen im Bereich von 10 V und Frequenzen von 100 kHz bis 10 MHz in Abhängigkeit der Flüssigkeit und der Partikel verwendet. Für die Messungen in dem Messkanal beträgt die Spannung unter 2 V und die Frequenzen betragen 10 kHz bis 200 MHz.

[0046] Mit dem vorstehend beschriebenen mikrofluidischen Bauelement ist eine integrierte schnelle und kostengünstige "On-Chip"-Erkennung mit anschließender Trennung möglich.

Patentansprüche

1. Mikrofluidisches Bauelement aus einem Substrat mit
 - mindestens einem Kanal (2) zum Durchführen individueller Partikel (17) in einem Fluid, wobei der Kanal (2) umfasst:
 - einen Vorbereitungsbereich (6) zur gezielten Beeinflussung und Vereinzelung der Partikel (17),
 - einen Messkanalbereich (7) mit Elektrodenanordnungen zur Charakterisierung der Partikel (17), und
 - einen Sortierbereich (8) mit Elektrodenanordnungen zum Sortieren der in dem Messkanalbereich (7) identifizierten Partikel (17) mittels Dielektrophorese; und
 - Leiterbahnen (12), die elektrisch mit den Elektroden (13, 14', 14'', 20-30) in den einzelnen Bereichen (6-8) verbunden sind, um Signale zu den Elektroden bzw. Signale von den Elektro-

den zu übertragen.

2. Bauelement nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Querschnitt des Kanals (2) in dem Messkanalbereich (7) wesentlich geringer ist als der Querschnitt im Vorbereitungs- und im Sortierbereich (6 bzw. 8).
3. Bauelement nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** in dem Vorbereitungsbereich (6) mittels Elektrodenanordnungen die Partikel (17) durch Dielektrophorese beeinflusst werden, wobei die ersten Elektrodenanordnungen Elektrodenanordnungen (9) aufweisen, die die Partikel (17) zuerst Vereinzelnd und anschließend in einer bestimmten Position im Fluidstrom halten.
4. Bauelement nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Elektrodenanordnungen (9) zum Vereinzelnd der Partikel (17) schräg zur Strömungsrichtung angeordnete ersten Elektroden (13) mit einer im wesentlichen trichterähnliche Anordnung aufweisen, und in Strömungsrichtung daran anschließende beabstandete parallele zweite Elektroden (14', 14'') in einer ebenfalls trichterförmigen Anordnung mit einer Durchtrittsöffnung (19) aufweist.
5. Bauelement nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Elektrodenanordnungen (9) zum Positionieren Elektroden (20, 21) aufweisen, die die Partikel (17) in der räumlichen Mitte des Fluidstromes halten.
6. Bauelement nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Elektrodenanordnungen (9) trichterförmig angeordnete Elektroden (20, 21) mit schräg zur Strömungsrichtung angeordnete und von den Wänden (15, 16) in den Kanal (2) ragende Elektrodenarmen (22), die eine zentrale Durchtrittsöffnung (19) bilden, und direkt daran anschließende, im Abstand der Durchtrittsöffnung (19) parallel verlaufende Elektrodenarme (23) aufweisen, wobei die ersten Elektrodenarme (22) der Ausrichtung der Partikel (17) in einer Ebene in der Mitte des Fluidstromes und die zweiten Elektrodenarme (23) der Ausrichtung der Partikel (17) entlang der Mittellinie des Fluidstromes dienen.
7. Bauelement nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die zweiten Elektrodenarme (23) eine Länge aufweisen, die ausreichend ist, um den auf die Partikel (17) in dem Zwischenraum zwischen den Elektroden wirkenden Kräften ein Gleichgewichtszustand zu ermöglichen.
8. Bauelement nach einem der vorangegangenen Ansprüche 2 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass**

der Abstand zwischen den Elektroden (13; 14', 14'')
das 2 bis 4fache des Partikeldurchmessers beträgt.

9. Bauelement nach einem der vorangegangenen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Elektrodeneinrichtungen in dem Kanal (2) im Messkanalbereich (7) wenigstens zwei Abtastbereiche zur Messung der Impedanz in dem jeweiligen Bereich aufweist. 5
10. Bauelement nach einem der vorangegangenen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Kanal (2) im Messkanalbereich (7) einen Querschnitt aufweist, der nur geringfügig größer ist als die Größe der durchströmenden Partikel (17) beträgt. 10
11. Bauelement nach einem der vorangegangenen Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Elektrodeneinrichtungen in dem Kanal (2) im Messkanalbereich (7) eine erste Elektrodenanordnung (26) zur Führung der Partikel (17) auf eine bestimmten Bahn in dem Messkanal und eine zweite Elektrodenanordnung zur Erzeugung von zwei Abtastbereichen (24, 25) zur Messung der Impedanz in dem jeweiligen Bereich aufweist, wobei der eine Abtastbereich (24) in der Bahn des zu messenden Partikels (17) und der andere Abtastbereich (25) außerhalb der Bahn zur Bereitstellung einer Referenzimpedanz angeordnet ist. 15
12. Bauelement nach einem der vorangegangenen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Elektrodeneinrichtungen in dem Sortierbereich (8) eine erste Sortierelektrodenanordnung (29) und wenigstens eine zweite Sortierelektrodenanordnung (30) aufweisen, wobei die erste Sortierelektrodenanordnung (29) in der Bahn (33) der Partikel (17) und die zweite Sortierelektrodenanordnung (30) seitlich der Bahn der Partikel angeordnet ist, um von der ersten Sortierelektrodenanordnung (29) aussortierte Partikel (17) gezielt weiter zu leiten. 20
13. Bauelement nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** die zweite Sortierelektrodenanordnung (30) schräg zur Strömungsrichtung angeordnet ist und einen Ausgang (31) zum Passieren des Partikels (17) aufweist. 25
14. Bauelement nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** nach der zweiten Sortierelektrodenanordnung (30) eine Gabelung (32) in dem Kanal (2) des Sortierbereichs (8) angeordnet ist. 30
15. Bauelement nach einem der Ansprüche 13 bis 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** in dem Sortierbereich (8) in der Bahn der Partikel (17) vor der ersten Sortierelektrodenanordnung (29) eine Elektrodenanordnung (27, 28) zum Ausrichten der Partikel (17) angeordnet ist, die die vom Messkanal (2) aus dem Messkanalbereich (7) kommenden Partikel (17) auf eine möglichst schmale Bahn im Fluidstrom leitet, und die Elektroden der ersten Sortierelektrodenanordnung (29) schräg in der Bahn der Partikel angeordnet sind und eine Länge aufweisen, die im wesentlichen der Breite der Bahn entspricht. 35
16. Verfahren zum Sortieren von Partikel in einem Fluidstrom durch ein mikrofluidisches Bauelement, **gekennzeichnet durch**
A Vereinzeln der Partikel (17) mittels Dielektrophorese und anschließender Positionierung der Partikel in der räumlichen Mitte des Fluidstromes,
B Charakterisieren der vereinzelteten Partikel in einen engen Fluidstrom in einem Messkanalbereich (7) **durch** Impedanzmessung,
C Sortieren der in dem Messkanalbereich (7) aufgrund der in B ermittelten Kenngrößen erfassten Partikel mittels Dielektrophorese **durch** aktives Aussortieren von Partikel aus der ersten Partikelbahn (33) und gezieltes Weiterleiten der aussortierten Partikel in einer zweiten Partikelbahn (34), die im wesentlichen parallel zu der ersten Partikelbahn (33) verläuft,
D Trennen der Partikelbahnen (33, 34) und
E gegebenenfalls Wiederholen der Schritte C. und D. 40
17. Verfahren nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** zur Charakterisierung der Partikel (17) zwei oder mehr elektrische Felder (24, 25) in dem Messkanal erzeugt und durch Vergleich der Felder Informationen über die Größe und elektrischen Eigenschaften der Partikel ermittelt werden. 45
18. Verfahren nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet, dass** zur Erzeugung der elektrischen Felder eine oder verschiedenen Spannungen mit einer Frequenz von 1 kHz bis 200 MHz verwendet werden. 50
19. Verfahren nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Spitze-zu-Spitze-Spannungen maximal 2 V betragen. 55
20. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche 16 bis 19, **dadurch gekennzeichnet, dass** vor dem Sortieren die Geschwindigkeit der Partikel optisch oder elektrisch gemessen wird.
21. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche 16 bis 20, **dadurch gekennzeichnet, dass** vor dem Sortieren die Partikel auf eine Partikelbahn im Fluidstrom fokussiert werden.

22. Verfahren nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet, dass** anschließend Partikel durch Errichten oder Entfernen einer ersten elektrischen Feldbarriere (29) aus der Partikelbahn (33) herausgeführt und entlang einer weiteren Feldbarriere (30) auf eine zu der ersten Partikelbahn (33) im wesentlichen parallelen Partikelbahn (34) geleitet und anschließend der Fluidstrom entsprechend der beiden Partikelbahnen (33, 34) getrennt wird.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

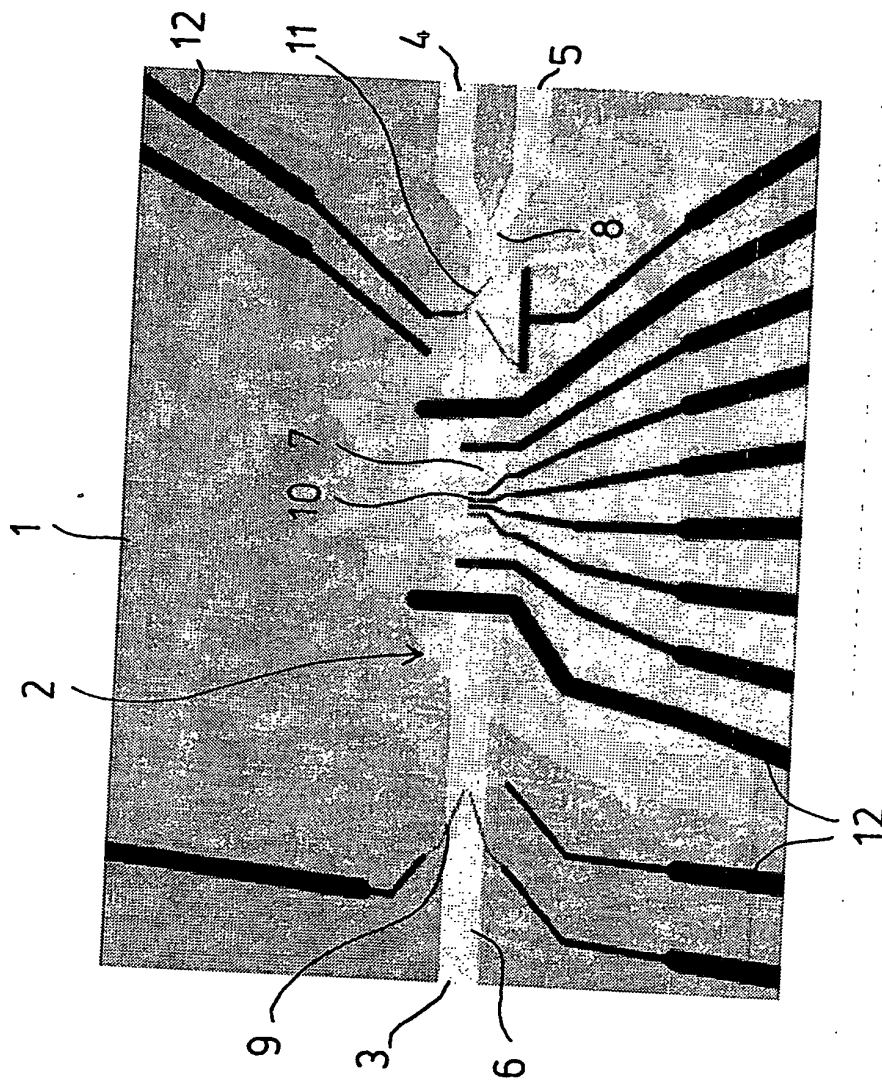
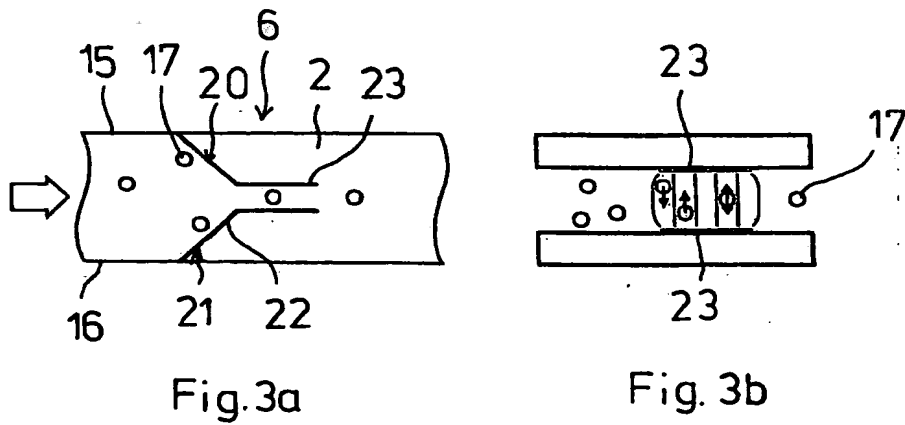
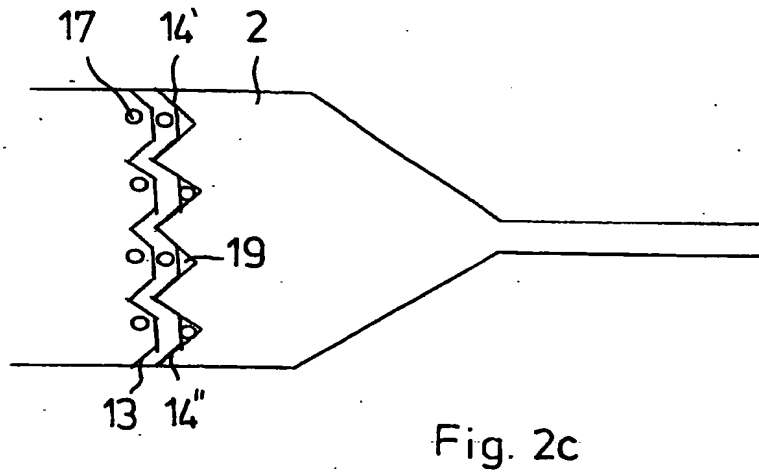
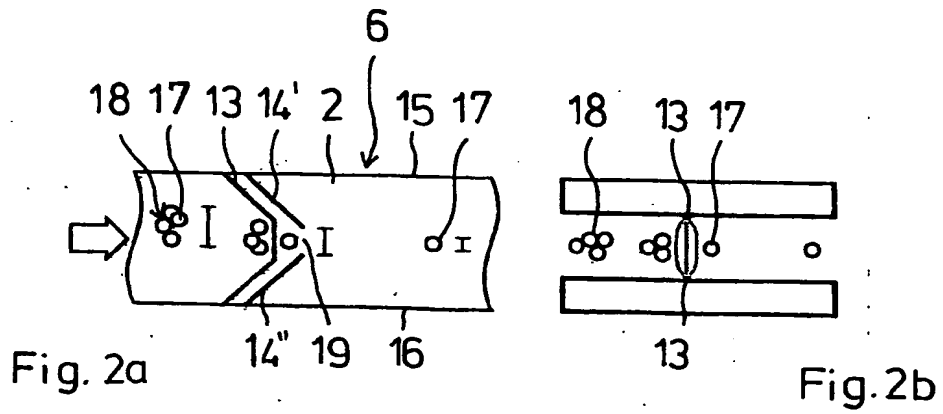


Fig.1



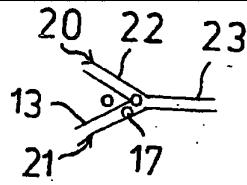


Fig. 4

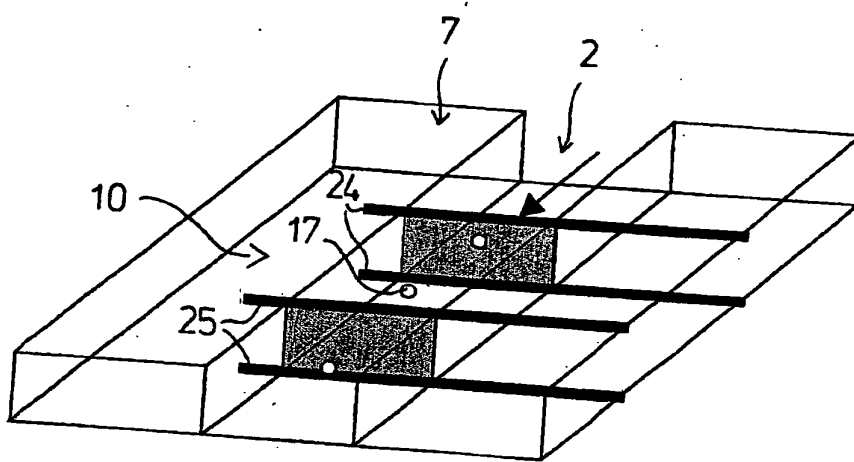


Fig. 5a

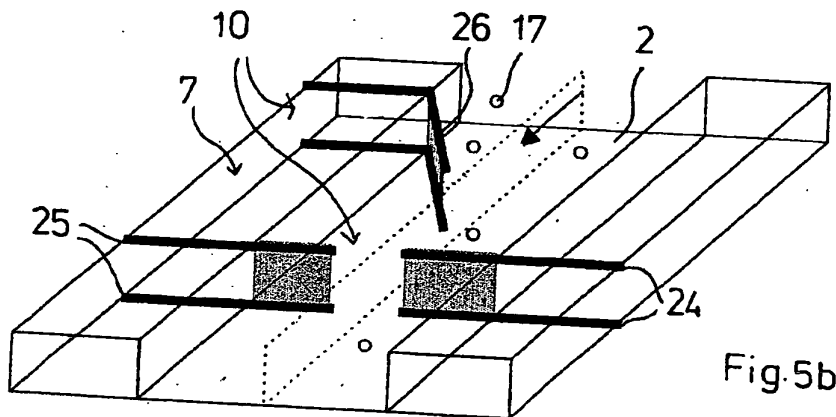


Fig. 5b

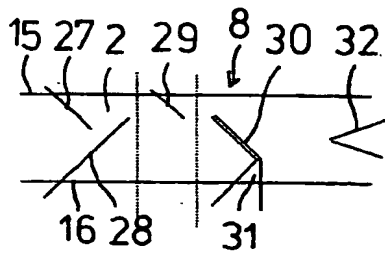


Fig. 6a

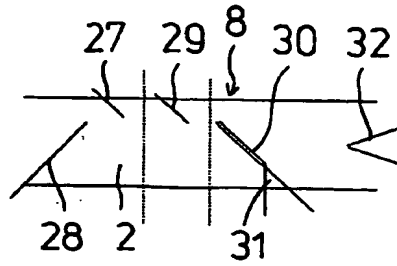


Fig. 6b

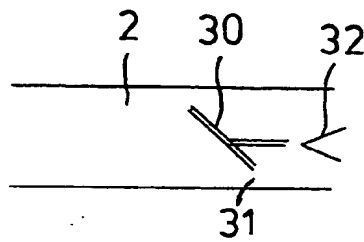


Fig. 6c

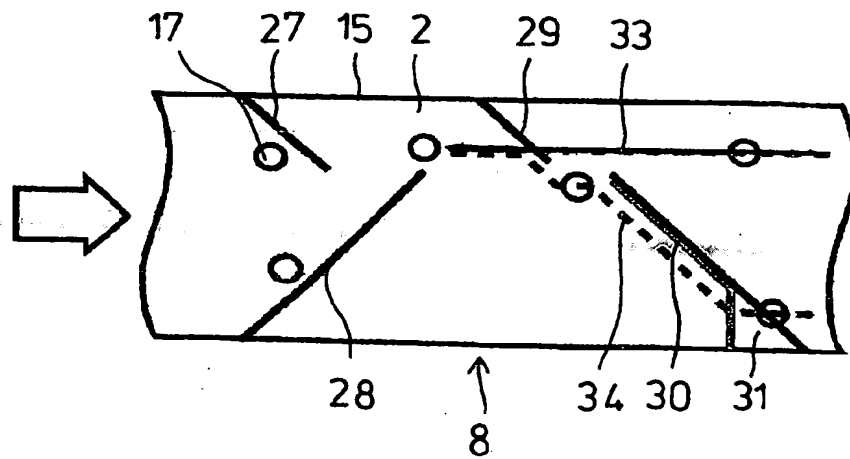


Fig. 6d

Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 02 00 2437

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
D,Y	WO 00 00293 A (HAGEDORN ROLF ;FUHR GUENTER (DE); MUELLER TORSTEN (DE); SCHNELLE T) 6. Januar 2000 (2000-01-06) * Seite 12, Absatz 1 * * Seite 14, Absatz 3 - Seite 19, Absatz 2 * * Seite 35, Absatz 2 * * Seite 37, Absätze 1,2; Abbildungen 2,16 *	1-22	G01N15/10 G01N33/487 B03C5/00
Y	WO 00 17630 A (RABBITT RICHARD D ;UNIV UTAH RES FOUND (US); FRAZIER A BRUNO (US);) 30. März 2000 (2000-03-30) * Seite 6, Zeile 14 - Seite 9, Zeile 35; Beispiel 2 *	1-22	
A	US 6 136 171 A (CALDWELL KARIN D ET AL) 24. Oktober 2000 (2000-10-24) * Spalte 4, Zeile 40-49 * * Spalte 7, Zeile 41-59 *	1,16	
D,A	FUHR G ET AL: "RADIO-FREQUENCY MICROTOOLS FOR PARTICLE AND LIVE CELL MANIPULATION" NATURWISSENSCHAFTEN, BERLIN, DE, Bd. 81, 1994, Seiten 528-535, XP000826650 * das ganze Dokument *	1,16	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7) B03C G01N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 19. April 2002	
		Prüfer Müller, T	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EPO FORM 1503 03 82 (Pde/C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 02 00 2437

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

19-04-2002

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0000293	A	06-01-2000	DE	19853658 A1	31-05-2000
			DE	19860118 C1	28-09-2000
			WO	0000292 A1	06-01-2000
			WO	0000293 A1	06-01-2000
			EP	1089823 A1	11-04-2001
			EP	1089824 A1	11-04-2001
			WO	0000816 A1	06-01-2000
			EP	1092144 A1	18-04-2001
WO 0017630	A	30-03-2000	US	6169394 B1	02-01-2001
			AU	6149999 A	10-04-2000
			WO	0017630 A1	30-03-2000
US 6136171	A	24-10-2000	AU	4436299 A	10-04-2000
			WO	0016907 A1	30-03-2000

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/82

THIS PAGE BLANK (USPTO)

